中華農業研究（Jour. agric. Res. China）30(2)：121～131（1981）

菸草、水稻及蘆筍培養花葯褐變與癒傷組織形成之關係[1]

蔡新聲[2]

摘要：利用菸草、水稻及蘆筍三種主要作物的花葯培養，調查花葯癒傷組織的形成與培養花葯褐化間的關係，發現菸草及水稻，培養花葯過早褐變會降低癒傷組織形成的能力，兩種作物均顯示在培養第4週以後才褐化的花葯，所具有誘導癒傷組織或胚狀體形成的能力最高。秈稉稻雜種的花葯，培養後褐變的早晚，各雜交組合間亦呈褐變早者癒傷組織形成能力低，褐變晚者癒傷組織形成能力高的趨勢。蘆筍的花葯會在培養後第2～3週間轉變成褐色或白色，資料顯示花葯的褐變與癒傷組織的形成有明顯的正相關（相關係數 r＝0.804**），白化的花葯幾乎不具有形成癒傷組織的能力。花葯早期褐變所導致癒傷組織形成能力的低下，可能係酚類物質（phenolic compound）氧化所生之 quinone 產生毒害，不利於小胞子發育形成癒傷組織所致。蘆筍培養第3週後褐化之花葯形成癒傷組織之能力較高，其原因可能爲蘆筍花葯癒傷組織的形成在培養後2～3週間。白化之花葯可能係已死亡或活力減低之花葯變色所致。

利用花葯培養獲得的單元體進行染色體數的倍加，可得完全同質的純二元體，這種方式的作物育種不但能縮短時間，且能提高選拔效果，是先進國育種工作人員最近採行的育種新方法 [2]。唯目前一般作物誘導花葯產生癒傷組織或單倍體的頻率仍太低，因此限制了花葯培養被廣泛的應用於實際的育種工作上。

蔡和林，Mii 等氏都指出花葯褐變之速率與植物體形成之間有明顯的負相關 [1,11]。Anagnostakis 氏及 Bajaj 氏等也發現菸草花葯培養時，若能抑制花葯之褐變，則可增加植物體形成之比率 [3,4]。爲配合育種使花葯培養達到實用化的階段，提高花葯癒傷組織形成的能力是我們應努力的目標。本文係有關菸草、水稻及蘆筍等三種主要作物的花葯培養，希望由癒傷組織形成力與花葯褐化的關係，找出提高花葯 callus 形成能力的方法。

材料與方法

一、菸草花葯培養

採取溫室種植 Wisconsin 38 品種，花萼及花冠之比約爲1：1的花蕾，以 5% Purex（含 0.5% 次氯酸鈉）消毒 10 分鐘後，再以無菌水清洗數次，然後將花葯自花蕾中取出接種於培養基上。花葯的採取需特別小心，以避免花葯壁等體細胞組織受到傷害；每個花蕾含5個花葯，取其中一個立刻以醋洋紅壓潰法檢定其時期，若發現小胞子正值第一次有絲分裂期，則將剩餘四個花葯培養於含有 10 ml 裝於 25×150 mm 試管之培養基上。基本培養基採用含有3%蔗糖，0.8% phytagar, 0.4 mg/l thiamine·HCl 及 100 mg/l inositol 之 Murashige and Skoog (MS) (1962) 基

1. 臺灣省農業試驗所 研究報告 第 963 號。
2. 本所農藝系技正・臺灣省 臺中縣 霧峰鄉。

本鹽類培養基[12]。

二、水稻花葯培養

水稻花葯培養所用的材料為臺農 67 號，F_1-3（臺中秈3號／臺農 67 號 ／／IR 30), F_1-4 (BG 35-2/PI 162319／／Milyang 23), F_1-11（高雄育 104／臺農67號），F_1-14 (M 9/IR30), F_1-15 (M 9/嘉農育 247) 及 F_1-21 (M 9／／Tan 1/Ta-Poo-Cho-Z) 等雜交組合之花葯。臺農 67 號品種及雜交 F_1 之稻穗，係採自本所農藝系稻作研究室種植於臺中縣霧峰鄉試驗農場的植株。將劍葉葉耳距下位葉葉耳約 5 cm 時之稻穗連同劍葉摘下，以 70% 的酒精擦拭葉鞘外部後，將幼穗取出，浸漬於 70% 酒精中 30 秒，再以 0.5% 的次氯酸鈉消毒 3 分鐘。經消毒後之稻穗以無菌水沖洗 3～4 次，移至含 5 ml 改良液體 MS 培養基之 9 cm 培養皿上，以鑷子挑取單核期之花葯，接種於含有 10 ml 固體培養基之試管上[6]。基本培養基為無機鹽類（除 Na-Fe-EDTA 外）減半，配合 6% 蔗糖，0.8% agar, 100mg/l inosital, 4 mg/l α-Naphthaleneacetic acid (NAA) 及 2 mg/l 6-Furfurylaminopurine (Kinetin) 之改良 MS 培養基。

三、蘆筍花葯培養

蘆筍花葯為取自臺南改良場本場及義竹工作站之美國 UC 系統優良品種。將蘆筍花蕾經 10°C 低溫之儲藏 5 小時後（由臺南搬運至農試所），以 10% Clorox（含0.5%次氯酸鈉）消毒10分鐘，再以無菌水沖洗數次後，將不同發育時期或不同品種之花葯自花蕾中取出接種於培養基上。基本培養基為含有 6% 蔗糖，0.8% phytagar, 100 mg/l inosital, 2 mg/l NAA 及 1 mg/l Benzyl aminopurine (BA) 之改良 MS 基本鹽類培養基。

以上三種作物花葯培養所採用的培養基，pH 在消毒前均經調整為 5.7±0.1，以 15 lb/in^2, 121°C 之高溫高壓消毒 15 分鐘。配製完成之培養基均於一星期內使用。

四、培養環境及調查統計分析

將上述接種完畢之試管材料置於 27°±1°C 之恆溫，以黑暗（蘆筍）或 1,000 lux（菸草及水稻）之光強，每日行 16 小時之照光下培養。每 3～7 天調查花葯褐變及癒傷組織或單倍體形成的情形，花葯呈咖啡色或黑色者均視為褐變，以二項分佈求出百分比之信賴介值，做為不同處理之比較。

結果與討論

一、菸草

表 1 為 1978 年 9、10 及 11 等三個月份菸草花葯培養，形成單倍體之花葯數及每個花葯獲得單倍體數之結果；資料顯示 11 月份不但形成單倍體的花葯數多，且每個花葯形成的單倍體數也較 9、10 兩月份高，9 月份所培養的菸草花葯單倍體形成能力最差，其原因蔡氏曾報導可能與 9 月份的高溫或長日照有關[19]。

表 1. 9～11月菸草培養花葯之單倍體形成率及每個花葯所形成之單倍體數

Table 1. The percentage of embryogenic anther and number of plant regenerated per anther of cultured tobacco anther taken from donor plants at September to November.

Flowering months	Number of anther cultured	Embryogenic anther			Total plant produced	No. of plant regenerated per anther
		No.	%	0.95 CL^a		
September	354	110	31	26-37	837	2.4±1.9
October	114	48	42	32-52	453	4.0±1.6
November	334	228	68	63-73	7,561	22.6±5.3

a. 95% Confidence limit.

表 2 爲三個培養月份下，不同培養日期之菸草花葯，以週爲單位褐化的百分比。資料顯示褐化的情形在各培養日期間並沒有一定的關係。而表 3 以不同時間內褐化之花葯形成單倍體的百分比來比較，却顯示出 11 月份所培養的花葯，在培養後第 3 週及第 4 週才褐化的花葯約有 75% 的花葯可形成單倍體，11 月 15 日第 4 週才褐化的花葯，可形成單倍體的花葯更高達 96%，而 9 月份三次不同培養日期，在培養第 3 週以後才褐化的花葯却只有 35% 左右可形成單倍體，10月份相同時期的花葯形成百分比約 50% 則正好介於 9、11 月間。早期如培養後 2 週內褐化的花葯單倍體形成的能力，6 個不同的培養日間並沒有太大的差異。這種資料顯示 11 月份所培養的花葯具有較高的單倍體形成能力，主要原因爲晚期褐化之花葯具有較强之單倍體形成能力。

表 2. 不同時期之菸草花葯培養以週爲單位褐化之百分率

Table 2. Percentage of browning anther at intervals of culture in tobacco anther culture initiated at different dates.

Dates of culture	No. of anther inspected	Days in culture							
		0～7		8～14		15～21		over 22	
		No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
13/Ⅸ	99	17	17.2	5	5.1	38	38.4	39	39.4
22/Ⅸ	118	12	10.2	8	6.8	23	19.5	75	63.6
28/Ⅸ	237	26	11.0	24	10.1	116	48.9	71	30.0
5/Ⅹ	228	55	24.1	25	11.0	106	46.5	42	18.4
1/Ⅺ	170	21	12.4	43	25.3	31	18.2	75	44.4
15/Ⅺ	164	24	14.6	23	14.0	25	15.2	92	56.1
Total & Average	1016	155	15.3	128	12.6	339	33.4	394	38.8

表 3. 不同時期之菸草花葯培養以週爲單位形成單倍體花葯之百分率

Table 3. Percentage of embryogenic anther at intervals of culture in tobacco anther culture initiated at different dates.

Dates of culture	Days needed for cultured anther turning brown			
	0～7	8～14	15～21	over 22
13/Ⅸ	5.9	0.0	47.4	33.3
22/Ⅸ	0.0	25.0	34.8	29.3
28/Ⅸ	15.4	25.0	30.2	31.0
5/Ⅹ	5.5	24.0	43.4	54.8
1/Ⅺ	4.8	16.3	77.4	73.3
15/Ⅺ	4.2	30.4	68.0	95.7

圖 1 爲以表 3 的資料綜合整理所得形成單倍體花葯的百分比，並以 2 項分佈法求得 95% 信賴介值 (confidence limit) 的柱形圖。圖中顯示菸草花葯的培養，單倍體形成的能力與培養花葯褐化的早晚成反比。例如：在培養一週內褐化的花葯只有 6.5% 可形成單倍體，第 2 週褐化的花葯則增高爲 21.9%，遲至第 3 週以後才褐化的花葯則約有半數以上具有形成單倍體的能力。

表 4 爲菸草不同培養日期下，花葯褐變的早晚與每個花葯形成單倍體數目之關係；資料顯示具有

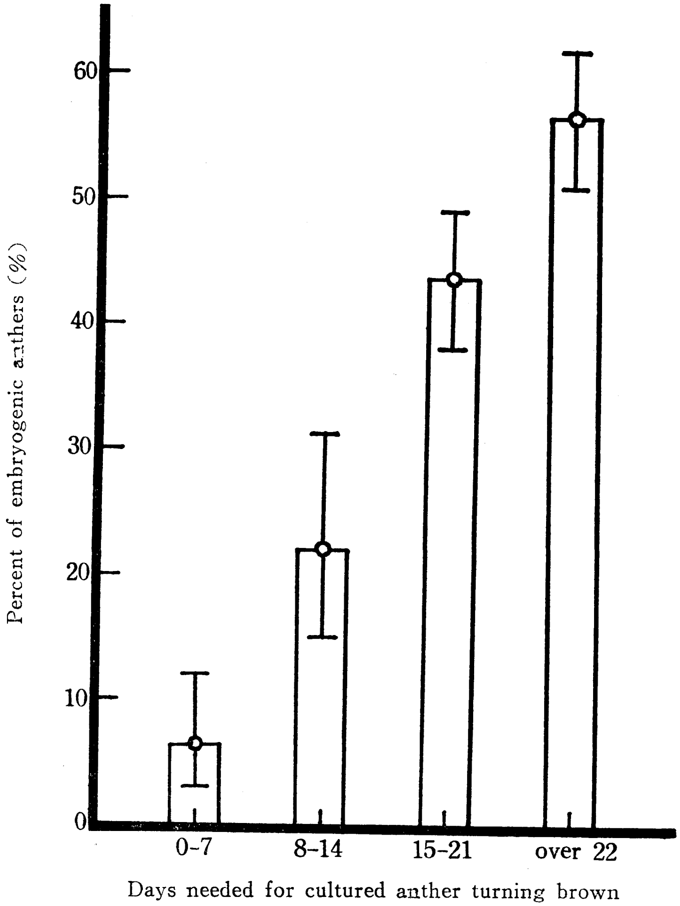

圖 1. 菸草培養花葯褐化與單倍體形成之關係

Fig. 1. The relationship beeween anther browning and embryogenesis in tobacco anther culture.

單倍體形成能力較佳的 11 月份，在培養 3 週後才褐化的花葯，每個花葯形成單倍體的數目高於其它培養日期甚多，而在培養第 2 週褐化的花葯，單倍體形成的數目比起其它月份增加不多，第一週即已褐化之花葯，幾乎不具有單倍體形成的能力。9 月份培養花葯誘導單倍體數目低落的原因，主要在晚期褐化的花葯（3 週以上），形成單倍體的數目並沒有太大的改善。

表 4. 不同時期之菸草花葯培養，不同週數褐化之花葯所形成之單倍體數

Table 4. The number of plant regenerated per anther at intervals of culture in tobacco anther culture initiated at different dates.

Dates of culture	Days needed for cultured anther turning brown			
	0~7	8~14	15~21	over 22
13/Ⅸ	0.1	0.0	3.9	3.1
22/Ⅸ	0.0	0.4	1.7	1.2
28/Ⅸ	1.9	1.9	3.3	1.3
5/Ⅹ	0.7	2.4	4.3	5.4
1/Ⅺ	1.2	3.5	40.8	30.1
15/Ⅺ	0.0	3.8	18.8	31.0

菸草花葯壁在花葯培養中所扮演的角色，及因花葯褐變早晚所造成植物體的形成與否，許多文獻均曾提及；Pelletier 和 Ilami氏[16]發現菸草花葯培養超過 25 天才褐變之花葯，產生植物體的能力比早期褐變之花葯强。Mii 氏[11] 報導菸草花葯培養在最初 2 星期褐變之花葯，其植物體形成百分比極低，能維持較長時間才褐變之花葯，形成植物體之能力較高，雙核期之花葯比單核期或有絲分裂期更易褐變，他解釋爲雙核期之花葯因對切離之方式、消毒方法及培養基組成份極爲敏感所致，所以他認爲花葯壁的組織對花粉粒之分裂，可能扮演著一種保護作用。Dunwell 氏[8] 報導菸草母株於 8 小時短日强光，20°C 下所產生之花葯，因花葯壁中之荷爾蒙正處於誘導花葯形成胚狀體之最佳平衡狀態，故培養後具有較高之植物體形成率。

蔡氏[19]報導花葯壁最內的 Tapetum 層，發育的好壞會對菸草花葯培養單倍體的形成造成重大的影響。Maheshwari(1950)及 Clowes and Juniper(1968)等氏認爲 Tapetum 層的細胞，因 DNA 合成比一般二倍體細胞快，故常久以來即被認爲是 DNA 的主要儲存場所，經分解後的 Tapetum 細胞，可能扮演著供給養份以爲小胞子發育的角色[7,10] Sunderland and Roberts 也曾報導菸草花葯培養 Tapetum 細胞的主要功用，爲供給小胞子發育成胚狀體過程中初期的養分[18]。Kohlenback 等氏(1978) 更以液體培養的方法證明了Tapetum層發育的好壞，是決定菸草分離小胞子能否發育成單倍體的主要因素之一[9]。本文所得的結果證明培養花葯初期的褐化，會使單倍體形成受到極大的影響。綜觀以上諸學者的發現及本文試驗結果得知，早期褐化的花葯，可能因 Tapetum 層細胞壞死，無法供給小胞子養分，因而使得單倍體的形成率降低。

二、水稻

圖 2 顯示臺農67號水稻花葯培養，以週爲單位調查花葯褐變的情形及癒傷組織形成能力間之關係，結果發現花葯褐變的早晚與癒傷組織之形成率具有負的相關關係。圖 2 顯示培養第 1 週即已褐變的

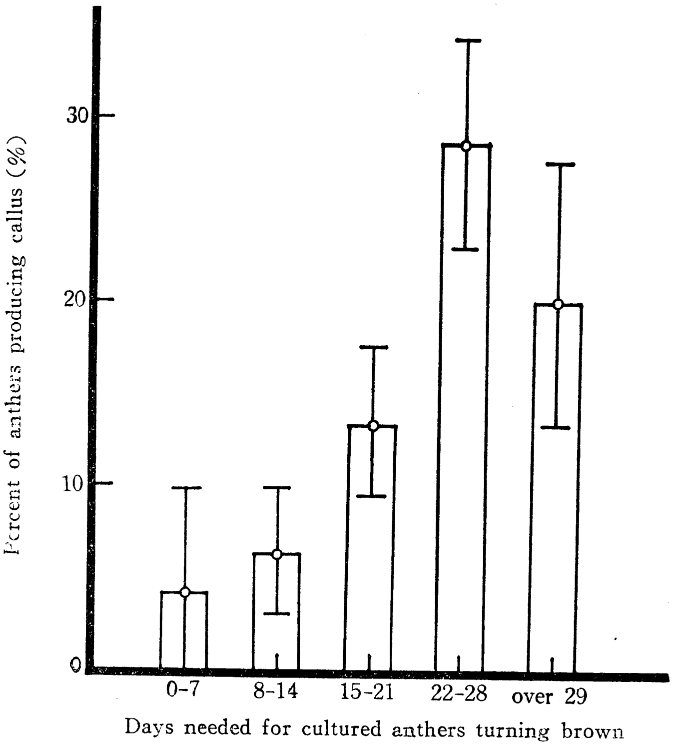

圖 2. 水稻培養花葯褐化與癒傷組織形成之關係

Fig 2. Relationship between percentage of anthers forming callus and anthers turning brown in rice anthers cultured

花葯，癒傷組織形成率只有約 4 %，隨著褐變的延緩，癒傷組織形成率提高，第 4 週才褐變的花葯癒傷組織形成率可高達 29%，超過第 5 週仍未褐變之花葯，其癒傷組織形成率則又降至 20% 左右；此乃因超過第 5 週仍未褐變之花葯含有白色的死亡花葯，因而降低其癒傷組織形成率。

六種雜交組合 F_1 的花葯培養，由圖 3 顯示花葯褐變之速率亦因不同之雜交組合而異，F_1-4 褐變速率最快，其它五種雜交組合之花葯褐變速率相差不大。再由圖 4 得知 F_1-4 之雜交組合癒傷組織形成率僅 1 %而已，而其它五種組合則都在 24～43% 之間，由圖 3 、4 可明顯看出，花葯褐變之速率與癒傷組織形成百分比間有極明顯的關係存在，即褐變速率愈快的花葯，其癒傷組織形成也愈差。

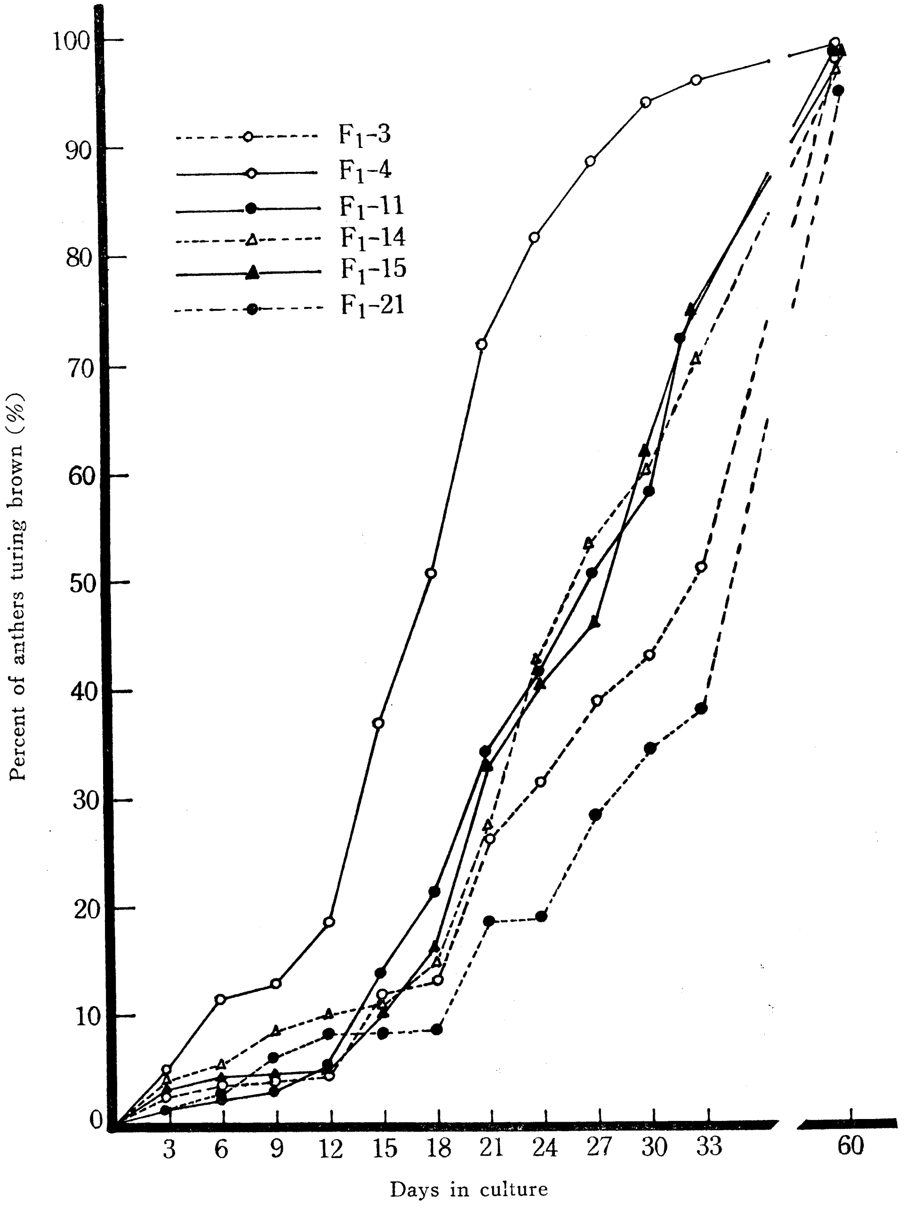

圖 3. 水稻不同雜交組合 F_1 培養花葯褐化之頻度

Fig. 3. Frequencies of anthers turning brown from different F_1 hybrid anthers culture of rice.

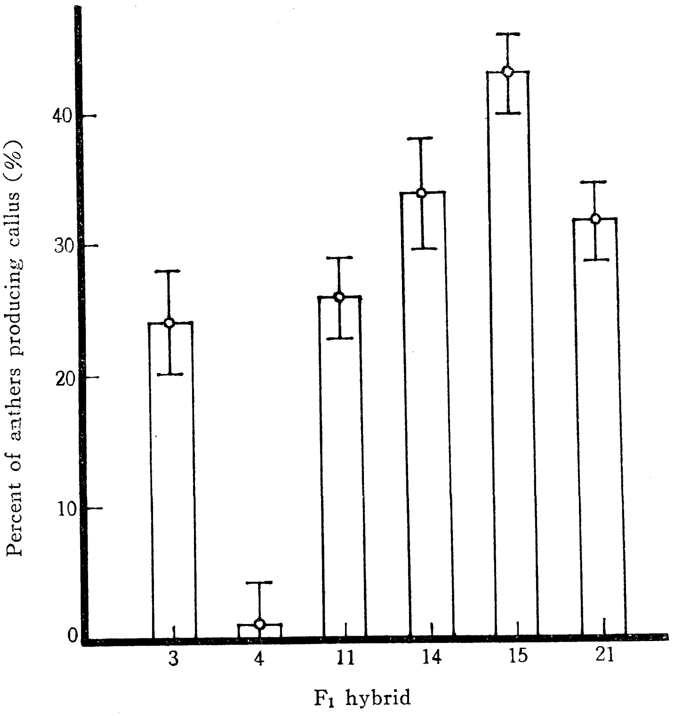

圖 4. 水稻不同雜交組合 F_1 花葯培養癒傷組織形成百分率

Fig. 4. Varietal difference in formation of callus of F_1 hybrid anthers culture of rice.

過早褐變的花葯（癒傷組織形成能力較差的原因）可能因花粉粒無法獲得來自花葯壁促進生長分裂之未知物質，因而使癒傷組織或植物體形成率降低。而遲至第 4 週以後才褐變之花葯，却又顯示褐變之物質對癒傷組織形成能力影響較小，其原因可能爲水稻花葯癒傷組織的產生，約在培養21天左右開始，陳氏發現培養 27 天之花葯，其花葯壁內花粉粒之發育，已分裂爲含有 100 個細胞左右之多細胞現象 [5]，這種癒傷組織前身之多細胞體已可利用培養基之養分，不必再依賴細胞壁傳送養分，是故培養第 4 週以後花葯之褐變對發育中的多細胞作用較小。

三、蘆筍

蘆筍的花葯經 3 週左右的培養，將由黃色轉變成褐色或白色，這種培養花葯早期顏色的改變，當與培養 2 個月後癒傷組織的形成相比較時，發現蘆筍花葯培養褐化的百分比與癒傷組織的形成間有極明顯的關係。表 5 的資料爲不同發育時期的蘆筍花葯，在不同培養條件及以 UC 157, UC 309 等數種主要品種的花葯爲培養材料之試驗結果。資料顯示花葯培養 3 週後褐化的百分比愈高，則癒傷組織的誘導率也愈好。圖 5 爲利用表 5 之 27 組試驗資料求得的迴歸線及相關係數，發現蘆筍培養花葯的褐化與癒傷組織形成的相關值高達 r=0.8046**，這種結果明白的顯示蘆筍花葯培養以 3 週後花葯的褐化與否爲其癒傷組織形成的第一步，褐化之花葯表示經三週後的培養仍然是活的，而變白的花葯則意味著死亡或無功能的花葯，故無法形成癒傷組織。

蘆筍的試驗結果乍看之下似與菸草或水稻的結果相反，但事實上却極爲一致。因蘆筍花葯培養後極少在初期褐化，大部分的花葯都在培養 2 ～ 3 週間轉變成褐色或白色。而蘆筍花葯癒傷組織的產生也在培養 2 ～ 3 星期間，所以褐化所產生的有毒物質影響極小。相反的白化的花葯意味著培養初期即已死亡或退化，所以癒傷組織形成能力極差。此種結果與水稻或菸草培養第 4 週褐化的花葯具有最高誘導癒傷組織或 embryoid 形成的能力，且大部分的癒傷組織或 embryoid 都在第 4 週後形成的結果

表 5. 蘆筍培養花葯褐化與癒傷組織形成間之關係

Table 5. The relationship between anther-browning and callus-formation in anther culture of asparagus.

Experiment No.	No. of anthers cultured	No. of anthers turning brown after 3 weeks in culture		No. of anthers producing anther callus	
		—No. —	—%—	—No. —	—%—
1	180	136	80	50	28
2	118	118	100	69	59
3	116	112	97	22	19
4	183	85	46	22	12
5	106	106	100	70	66
6	103	100	97	55	53
7	110	40	36	11	10
8	58	30	52	7	12
9	108	20	19	3	3
10	93	4	4	0	0
11	308	217	96	137	44
12	71	50	70	15	21
13	109	91	84	72	66
14	112	42	38	16	14
15	102	9	9	0	0
16	167	151	90	85	51
17	159	49	31	25	16
18	160	159	99	111	69
19	166	107	65	27	16
20	110	59	54	48	44
21	115	88	77	60	52
22	83	80	96	29	35
23	109	41	38	4	4
24	105	56	53	8	8
25	120	120	100	112	93
26	119	95	80	77	65
27	117	92	79	51	44

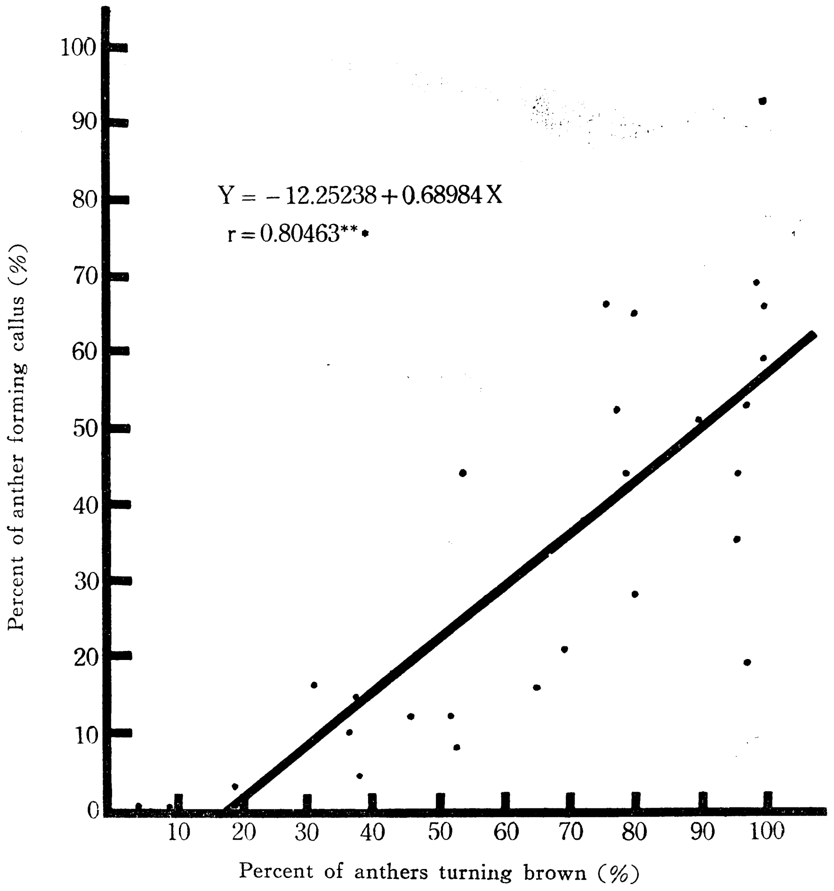

圖 5. 蘆筍培養花葯褐化與癒傷組織形成關係之迴歸線

Fig. 5. The regression line between anther-browning and callus formation in anther culture of asparagus.

極為一致。

結　論

許多報告均曾强調花葯壁在花葯培養癒傷組織的形成過程中，扮演著供應或傳送某種物質的角色，例如 Sharp, Raskin及 Sommer 等氏[17] 利用培養於培養基上的花葯表面，隔以一層濾紙的保護培養法 (nurse culture) 培養蕃茄的小胞子獲得成功。利用相同的方法，Pelletier 氏[15] 以 *Petunia hybrida* 之花瓣癒傷組織做菸草小胞子的保護培養獲得成功。Nitsch 氏[14] 報導培養基中加入曼陀羅經培養一週後之花葯抽出液，可成功的獲得曼陀羅小胞子培養的植物體。

為何花葯褐變過早會影響到癒傷組織形成能力？ Loomis 及 Battailer 兩氏認為切離組織所含之酚類物質 (phenolic compound) 會馬上氧化，使苯環上之氫氧基，被氧化形成 quinone之有毒物質，造成組織之褐變及傷害，因而抑制了癒傷組織形成[13]。

本試驗的結果也發現菸草、水稻及蘆筍等三種主要作物的花葯壁組織可能在花葯培養過程中提供著保護小胞子的角色，也可能扮演傳送某種與癒傷組織形成有關重要未知物質的角色，故欲提高花葯癒傷組織形成的能力，首要之務乃如何防止培養花葯早期的褐變，可行的方法如花葯初期的液體振盪培養，活性碳及抗氧化劑 (Antioxidant) 等之利用，或將有益於花葯癒傷組織形成率的提高，本研究室正針對上述諸可行方法做進一步試驗中。

引用文獻

1. 蔡秀錦、林明華・1977・水稻花葯培養以育成植株之研究。中華農業研究 26(2)：100-112。
2. 蔡新聲・1980・花葯培養單倍體植物之形成及應用。科學農業 28(11-12)：379-396。
3. Anagnostakis, S. L. 1974. Haploid plants from anthers of tobacco-enhancement with charcoal. Planta 115 : 281-283.
4. Bajaj, Y. P. S. and P. Nitsch, 1975. In vitro propagation of red cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata). J. Exp. Botany 26 : 883-890.
5. Chen, C. C. 1977. In vitro development of plants from microspores of rice. In Vitro 13 (8) : 484-489.
6. Chen, C. C. and C. M. Chen. 1979. A method for anther culture of rice. TCA Manual 5 (2) : 1051-1035.
7. Clewes, F. A. and B. E. Juniper. 1968. Botanical Monographs. Volume 8 : Plant cells. Blackwell Scientific Publications.
8. Dunwell, J. M. 1976. A comparative study of environmental and developmental factors which influence embryo induction and growth in culture anthers of *Nicotiana tabacum*. Environ. Exp. Bot. 16 : 109-119.
9. Kohlenhach, H. W., W. Wernicke and H. Lang. 1978. Androgenetic development of isolated microspores of *Hyoccyamus* and *Nicotiana*. *In* Production of natural compounds by cell culture methods. (Ed. by A. W. Alfermenn and E. Reinhard), Gesellschaft für Strahlen-und Umweltforschung mbH, München. : 284-294.
10. Maheshwari, P. 1950. An introduction to the embryology of angiosperms. New York-Toronto-London : McGraw-Hill. : 28—53.
11. Mii, M. 1976. Relationships between anther browning and plantlet formation in anther culture of *Nicotiana tabacum* L. Z. Pflanzenphysiol. Bd. 80 S : 206-214.
12. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15 : 473-497.
13. Loomis, W. D. and J. Battaile. 1966. Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. Phytochemistry 5 : 423-438.
14. Nitsch, J. P. 1972. Haploid plants from pollen. Z. Pflanzenzüchtg. 67 : 3-18.
15. Pelletier, G. 1973. Les conditions et les premiers stades de lándrogenése in vitro chez *Nicotiana tabacum*. Soc. Bot. Fr., Memoires : 261-268.
16. Pelletier, G. and M. Ilami. 1972. Les facteurs de landrogenese in vitro chez *Nicotiana tabacum* L. Z. Pflanzenphysiol. Bd. 68. S : 97-114.
17. Sharp, W. R., R. S. Raskin and H. E. Sommer. 1972. The use of nurse culture in the development of haploid clones in tomato. Planta 104 : 357-361.
18. Sunderland, N. and M. Roberts. 1977. New approach to pollen culture. Nature 270 : 236-238.
19. Tsay, H. S. 1981. Effects of nitrogen supply to donor plants on pollen embryogensis in culture tobacco anthers. Jour. Agri. Res. China 30 (1) : 5-13.

The relationship between anther browning and callus formation in tobacco, rice and asparagus anther culture[1]

Hsin Sheng Tsay[2]

Summary

The relationship between anther browning and the ability of callus formation in three major crops was studied by using anther culture techniques. In rice and tobacco, it was found that earlier anther browning was associated with low ability of callus induction. Anthers turned brown about 4 weeks in culture showed the highest ability of callus or embryoid formation. Similar result was obtained in the culture of F_1 anthers from six cross combinations of japonica×indica rices. In asparagus, the color of anthers turned to brown or white after 3 weeks in culture. There was a positive correlation between anther browning and callus formation (r=0.804**). Callus was hardly induced from anthers with a white-color appearance.

For rice and tobacco, the low callus formation ability caused by anther browning at early stage was probably due to the production of quinones which are toxic to the microspores. The callus induction of asparagus was first appeared on anthers having been cultured for 3 weeks. This phenomenon was considered the main reason why browned anthers were able to produce callus with high freguency. On the other hand, white color might indicate low viability or even death of anthers during culture and hence low ability of callus formation.

1. Contribution No. 963 from Taiwan Agricultural Research Institute.

2. Senior Agronomist, Department of Agronomy, TARI, Wufeng, Taichung Hsien, Taiwan 431, ROC.